

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23702

研究課題名(和文) イヌ腫瘍の免疫抑制機構阻害剤の放射線増感効果における臨床研究

研究課題名(英文) Clinical study of synergistic effects of X-ray and anti-Programmed Cell Death-Ligand 1 antibody therapy in canine malignant tumor

研究代表者

出口 辰弥 (Deguchi, Tatsuya)

北海道大学・獣医学研究院・特任助教

研究者番号：10849962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、犬腫瘍細胞株を用いてX線照射によって犬の腫瘍の免疫回避機構(Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1))が誘導することを示した。症例分析において、犬の悪性黒色腫を対象に、放射線治療と抗PD-L1抗体の併用療法において肺転移の進行が遅延する傾向が認められ、放射線照射が抗腫瘍免疫を活性化することが示された。以上から、放射線治療によって腫瘍の免疫回避機構が誘導され、免疫応答による抗腫瘍効果が相殺され、治療効果が減弱されていることが示唆された。また、誘導された免疫回避機構を阻害することで、免疫療法を補う新しい放射線増感治療が実践できることが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は放射線による免疫抑制機構の獲得をイヌの腫瘍細胞株で評価し、腫瘍の免疫回避機構阻害剤の治療効果を放射線治療との併用下で評価することを目的としている。本研究の成果は、これまでの放射線治療ならびに免疫療法の問題点を解決するブレイクスルーとなり後続研究へ応用される可能性が非常に高い。また、本研究で得られた結果は獣医療だけに限定された問題ではなく、医療における根治に至らない腫瘍疾患に対しても適応可能な進展性のある研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) is an important molecule for immune evasion mechanisms. In this study, the expression levels of PD-L1 was evaluated to clarify whether irradiation induces PD-L1 expression in canine tumor cell lines. In addition, the synergistic effects of radiotherapy and anti-PD-L1 antibody therapy was investigated in dogs with oral malignant melanoma. This study showed that X-irradiation in canine tumor cell induces PD-L1 expression and it led immune tolerance of tumor. The combination therapy with radiation and anti-PD-L1 antibody may promising therapy to delay progression of lung metastasis with activation of anti-tumor immunity by radiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：イヌ 腫瘍 免疫療法 放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

放射線療法は腫瘍細胞の DNA を損傷させる作用に加えて、抗腫瘍免疫を活性化することで抗腫瘍効果を示す。しかし、放射線による抗腫瘍免疫の活性化は、自然発生の癌に対して生じることは稀であり、腫瘍の免疫回避機構によって相殺されると考えられている。腫瘍の免疫回避機構として Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) が重要であり、PD-L1 は外的な刺激によってその発現量が変化することが示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究は放射線照射によって腫瘍の PD-L1 の発現が誘導されるかを犬の腫瘍細胞株を用いて評価した。また、放射線照射と抗 PD-L1 抗体療法が相乗効果を示すかを犬の自然発生の悪性黒色腫を対象に調査した。

## 3. 研究の方法

放射線照射による PD-L1 発現誘導の解析のために、犬の腫瘍細胞株（骨肉腫：HMPOS、肺腺癌：CLAC、移行上皮癌：MegTCC）に対して、X 線照射（2、5 Gy）を行い、フローサイトメトリーを用いて PD-L1 の発現量を定量した。次に、HMPOS を用いて、Interferon-gamma、Tumor necrosis factor-alpha と X 線照射を組み合わせた条件で、PD-L1 の発現量を定量した。また、本学附属動物医療センターを受診した口腔内悪性黒色腫の犬の症例情報を元に、抗 PD-L1 抗体が放射線照射の効果を増感するかを調べるために、放射線治療を受けた Stage 、 の犬において、抗 PD-L1 抗体療法との併用群と放射線単独群の腫瘍縮小率ならびに無増悪期間を比較し、放射線照射が抗 PD-L1 抗体の効果を増強するかを調べるために、抗 PD-L1 抗体療法を受けた Stage の犬において、放射線照射の有無で群を分け、肺転移縮小率、無増悪期間、肺転移が認められてから死亡するまでの期間を比較した。

## 4. 研究成果

X 線照射単独では PD-L1 の発現増強は生じなかった（図 1）。照射 24、48、72 時間後のいずれにおいても、2 Gy とサイトカインの組み合わせによって PD-L1 を発現した陽性細胞率が有意に増加した（図 2）。

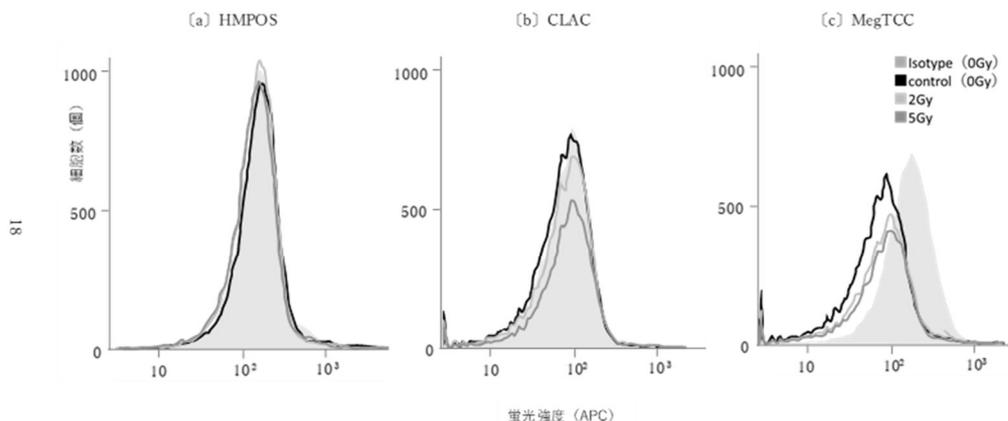


図 1. 放射線照射による各腫瘍細胞の PD-L1 蛍光強度

横軸は APC による蛍光強度を、縦軸は細胞数を表す。灰色の塗りつぶしは 0Gy の Isotype、黒色の線は 0Gy の抗 PD-L1 抗体（コントロール）、黄色の線は 2 Gy の抗 PD-L1 抗体、橙色の線は 5Gy の抗 PD-L1 抗体によるグラフを表す。

の線は 5 Gy 照射後に IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  を添加した抗 PD-L1 抗体によるグラフを表す。

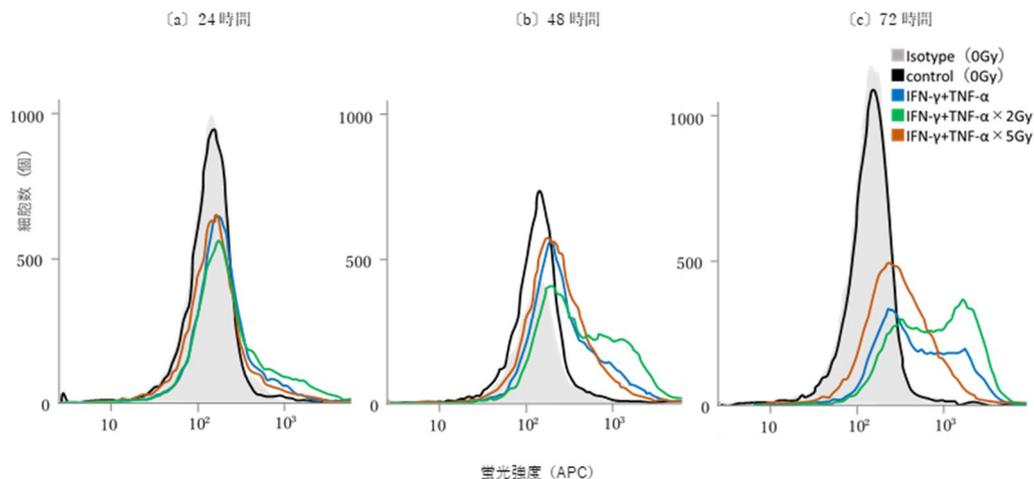


図2. 放射線照射と IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$  添加による HMPOS の PD-L1 蛍光強度

横軸は APC による蛍光強度を、縦軸は細胞数を表す。灰色の塗りつぶしは 0 Gy の Isotype、黒色の線は 0 Gy の抗 PD-L1 抗体 (コントロール)、青色の線は IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  を添加した抗 PD-L1 抗体、緑色の線は 2 Gy 照射後に IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  を添加した抗 PD-L1 抗体、茶色の線は 5 Gy 照射後に IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  を添加した抗 PD-L1 抗体によるグラフを表す。

症例分析におけるでは、併用療法群 3 例 (Stage [1]、 [2]) と放射線治療単独群 5 例 (Stage [1]、 [3]、 [1]) の腫瘍縮小率ならびに無増悪期間に有意差はなかった (表 1)。では、肺転移の縮小または消失を示した症例が、放射線照射群では 10 例中 3 例 (30.0%) と、非放射線照射群 11 例中 1 例 (9.1%) に対して多かった (図 2)。また放射線照射群では、無増悪期間および肺転移が認められてから死亡するまでの期間が延長する傾向が認められた (表 2)。

表 1. 放射線治療単独群と併用療法群の原発巣治療反応、奏効率および無増悪期間

	放射線治療単独群 <i>n</i> = 5	併用療法群 <i>n</i> = 3
原発巣治療反応		
CR	2 (22日、26日)	0
PR	1 (171日)	2 (40、49日)
SD	2	1
原発巣奏効率 (%)	60.0	66.7
無増悪期間 (日)		
II・III	113	65
IV	76	66.5
全体	113	65

CR および PR における ( ) 内の日数は、腫瘍が最大の縮小率を示した日の治療開始日からの日数を表す。

表 2. 抗 PD-L1 抗体療法を受けた放射線照射群と非放射線照射群の無増悪期間、肺転移が認められてから死亡するまでの期間、および肺転移の縮小・消失率

	放射線照射群 <i>n</i> = 10	非放射線照射法群 <i>n</i> = 11	<i>P</i> 値
無増悪期間 (日)	48.5	27	0.1951
肺転移～死亡期間 (日)	183	159	0.0643
肺転移の縮小・消失率 (%)	30.0	9.1	0.3108

本研究によって、犬腫瘍細胞における X 線照射が PD-L1 発現を誘導し、免疫寛容を引き起こす可能性が示された。症例分析では、併用療法において肺転移の進行が遅延する傾向が認められ、放射線照射が抗腫瘍免疫を活性化する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maekawa Naoya, Konnai Satoru, Nishimura Maki, Kagawa Yumiko, Takagi Satoshi, Hosoya Kenji, Ohta Hiroshi, Kim Sangho, Okagawa Tomohiro, Izumi Yusuke, Deguchi Tatsuya, Kato Yukinari, Yamamoto Satoshi, Yamamoto Keiichi, Toda Mikihiro, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41698-021-00147-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------